

Markører for påvisning av prostatakreft og prediksjon av prognose

Sammendrag

Bakgrunn. Prostatakreft er i dag den hyppigst forekommende kreftform i mange vestlige land. Vi trenger molekylære markører som kan forutsi fremtidig sykdomsutvikling, slik at vi kan identifisere de pasientene som trenger behandling.

Materiale og metode. Artikkelen er basert på litteraturgjennomgang etter søk i PubMed.

Resultater og fortolkning. Prostataspesifikt antigen (PSA) er en følsom serummarkør ved patologi i prostata (kreft, infeksjon, hyperplasi). Nivået av PSA er imidlertid dårlig korrelert til grad og stadium ved prostatakreft. Det finnes i dag ingen klinisk validerte prostatakreftspesifikke markører, verken diagnostiske eller prognostiske. Nye metoder som er tatt i bruk i den postgenomiske æra har imidlertid gitt oss mange nye kandidater. Blant dem som nevnes hyppigst er alfametylacylCoA-enzymet (AMACR), hepsin, glutation-S-transferase- π , EZH2 og DD3(PCA3). I mengden av nye kandidatmarkører er utfordringen å identifisere hvilke som oppfyller kravene som stilles til nye markører. Kunnskap om den enkelte kandidats funksjon i sykdomsutviklingen og evaluering av deres korrelasjon til kliniske parametere vil være viktig i denne sammenheng.

I Tidsskriftet nr. 21–23/2005 publiseres en serie artikler om diagnostisk molekylærbiologi. Serien er initiert av Jens Bjørheim og Jahn M. Nesland.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Kristin Austlid Taskén

k.a.tasken@medisin.uio.no

Fakultetsdivisjonen Aker
Universitetet i Oslo
og
Seksjon for urologisk molekylærbiologi
Oslo Urologiske Universitetsklinikk (OUU)
Aker universitetssykehus
Trondheimsveien 235
0514 Oslo

Anders Angelsen

Institutt for kreftforskning og molekylær medisin
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Aud Svindland

Avdeling for patologi og anatomi
Aker universitetssykehus

Turid Eide

Viktor Berge

Rolf Wahlquist

Steinar Karlsen

Seksjon for urologisk molekylærbiologi
Oslo Urologiske Universitetsklinikk

Prostatakreft er den vanligste kreftformen blant menn i Norge, med ca. 3 000 nye tilfeller hvert år (Kreftregisteret). Det store dilemmaet for klinikerer er at prostatakreft har en svært variabel og uforutsigbar biologi. Det kan være vanskelig å forutsi om en histologisk påvist svulst noen gang vil gi klinisk sykdom hos den enkelte pasient. I dag har vi ingen markører som er gode nok til å forutsi fremtidig sykdomsutvikling med den grad av sikkerhet vi ønsker. Økt kunnskap om de molekylære mekanismene bak utvikling av prostatakreft og hormonrefraktær prostatakreft vil forhåpentligvis bringe frem nyttige diagnostiske og prognostiske markører og signaturer for sykdommen.

Patologi ved prostatakreft

Forekomst av histologiske kreftforandringer i prostata hos menn over 50 år er 30–40 % (1). Hos en stor andel av disse mennene vil kreftforandringene forbli latente og aldri utvikle seg til klinisk kreftsykdom som gir symptomer eller reduserer leveutsiktene. Risikoen en mann løper for å dø av prostatacancer er faktisk så lav som 3 % (2). Selv om de fleste svulstene i prostata utvikler seg langsomt, bør man huske at spekteret er vidt og inkluderer også svært aggressive kreftformer. Disse oppdages ikke alltid ved biopsi, fordi prostatakreft ofte er multifokal og biopsimaterialet representerer dermed kun fragmenter av svulstområdene. Følgelig har en Gleason-gradering av biopsiene begrenset prognostisk verdi, fordi man ikke vet

om de inneholder de mest aggressive kreftcellene.

Tidlig på 1990-tallet tok man for alvor i bruk PSA for diagnostisering av prostatakreft i Norge. Dermed fikk patologene en markant økning av biopsier for diagnostikk av tidlig prostatakreft. Prostatabiopsiene inneholder ofte så lite svulstvev at det kan by på utfordringer å stille en malign diagnose med sikkerhet. Typiske maligne celleforandringer kan mangle og malign kjertelvekst med lav Gleason-grad likner til forveksling på benigne lesjoner i prostata (fig 1). Da konsekvensene av en falskt positiv diagnose er store, velges ofte diagnosen «fokus suspekt på adenokarsinom», og nye biopsier anbefales. Ved gjentatte biopsieringer av denne pasientgruppen påvises adenokarsinom hos opptil 25 % av pasientene (3). En annen problemstilling er om ett fokus med adenokarsinom representerer en klinisk aggressiv kreftform (4).

Immunhistokjemiske undersøkelser kan være nyttig å bruke i tvilstilfellene. Maligne prostatakjertler mangler basaceller, og påvisning av basaceller med spesiell immunfarging, som f.eks 34 β E12 (høymolekylært cytokeratin) eller p63 (p53 homolog), vil utelukke kreft. Fravær av farging betyr imidlertid ikke at kjertlene er maligne, og metoden bør benyttes sammen med markører som AMACR eller DD3(PCA3) som er rettet mot kreftcellene (5).

Arvelig prostatakreft

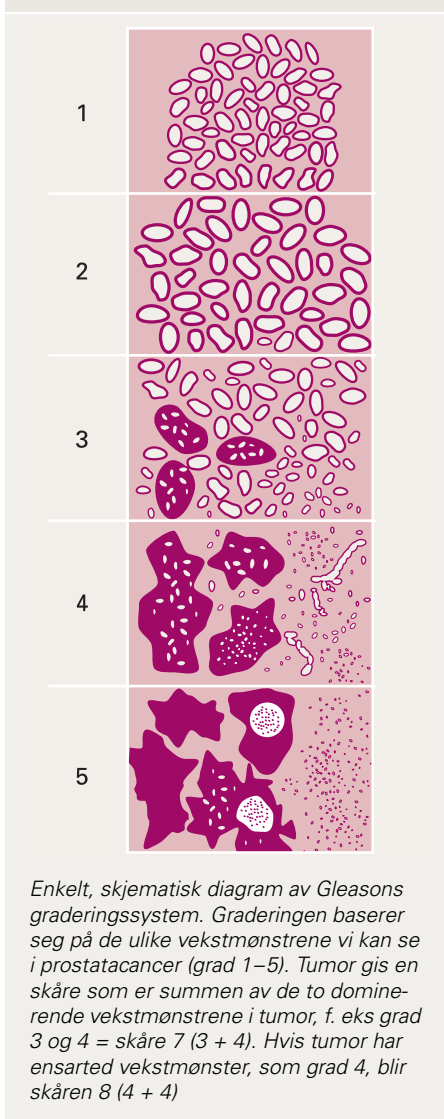
Arvelig prostatakreft antas å være årsaken til ca. 5 % av alle tilfellene av prostatakreft. Det er en sterk og konsistent korrelasjon mellom forekomst av prostatakreft i en familie og sannsynligheten for at slektninger vil bli rammet av sykdommen (6). Til tross for dette har det vært vanskelig å identifisere hvilke gener/genområder som er viktige. Resultate-



Hovedbudskap

- Serum-PSA har høy sensitivitet, men lav spesifisitet for identifisering av prostatakreftpasienter
- Vi mangler markører som kan identifisere klinisk signifikante prostatasvulster
- Ny teknologi har identifisert mulige nye diagnostiske og prognostiske markører, men disse må valideres før klinisk bruk

Figur 1



ne er sprikende, og foreløpig har man ikke identifisert noe enkelt gen som kan forklare utviklingen av prostatakreft hos et større antall pasienter. Dette tyder på at genetisk predisposisjon for prostatakreft er kompleks og sannsynligvis involverer mange gener.

Blant de genene som er identifisert i genomiske studier er HPC2/ELAC2, HPC1/RNASEL, MSR1 og BRCA2 (6).

BRCA2. Mutasjoner i BRCA2-genet er postulert å være assosiert med høy risiko for prostatakreft, men selv i gruppen av pasien-

ter med tidlig debuterende arvelig prostatakreft, kan man kun hos 2,7% av tilfellene relatere sykdommen til mutasjoner i BRCA2-genet (7). En studie av 16 familier på Island indikerer imidlertid at bærere av en gitt mutasjon (999del5) i BRCA2 vil utvikle en aggressiv kreftform (8). BRCA1- og BRCA2-mutasjoner er velkjent i forbindelse med arvelig brystkreft. I det fåtall av familier hvor det er en økt forekomst av både brystkreft og prostatakreft, er det svært sjelden at årsaken kan knyttes til mutasjoner i disse genene alene. Også her vil flere gener være involvert (9).

RNASEL. Optimismen var stor da man oppdaget mutasjoner i genet for RNASEL, fordi dette genet er lokalisert til HPC1-regionen (1q24-q25), det første locus som ble identifisert for arvelig prostatakreft. RNASEL er en proapoptotisk faktor og et interferonaktivert enzym som degraderer RNA og som dermed har en antiviral funksjon. Epidemiologiske studier indikerer at det er en korrelasjon mellom prostatitt og infeksjoner og risiko for utvikling av prostatakreft. Derfor vil tap av RNASEL-funksjon sannsynligvis fremme utvikling av svulster hos personer som har en infeksjon. Selv om mutasjoner i RNASEL ikke alene kan forklare den sterke sammenhengen mellom arvelig prostatakreft og det genomiske HPC1-locus, spiller RNASEL muligens en rolle i sykdomsutviklingen hos pasienter som ikke har arvelig prostatakreft, da mutasjoner av RNASEL også kan forekomme i denne gruppen.

Prostata spesifikt antigen

Prostata spesifikt antigen (PSA) er en kallekreinliknende protease som utskilles fra epitelet i prostata. Det spalter de geldannende proteinene i sædvæsken som bl.a. bedrer spermienes bevegelse. PSA er tidligere omtalt i Tidsskriftet (10). Måling av serumnivå av total-PSA (tPSA) har de siste 20 år hatt en sentral plass i utredning, diagnostikk, behandling og oppfølging av pasienter med prostatakreft.

Da PSA-testen ble introdusert i slutten av 1980-årene, ble den raskt tatt i bruk som screeningmetode for tidlig stadium av prostatakreft i flere land. Dette førte til at antall nydiagnostiserte med prostatakreft økte kraftig i den vestlige verden. Selv om mange helseorganisasjoner anbefaler PSA-screening, er det i Europa og USA fortsatt ikke blitt offisiell helsepolitikk å anbefale dette. Resultater fra store screeningstudier avvenges. Det er ennå ikke fastslått hvorvidt screening fører til økt overlevelse, men flere diagnostiseres med lokalisert sykdom fremfor lokalavansert eller metastasert prostatakreft (11). Det er enighet om at PSA-screening fører til overdiagnostisering. Noen menn vil altså kunne få en kreftdiagnose de verken vil få symptomer fra eller vil dø av.

PSA er en svært følsom markør som gjør det mulig å diagnostisere sykdommen lenge

før den manifesterer seg symptomatisk eller ved kliniske funn. Dessverre er den ikke en kreftspesifikk markør. Tabell 1 viser sannsynligheten for prostatakreft ved forskjellige total-PSA-nivåer hos menn med normalt palpasjonsfunn i prostata (12).

Siden den totale mengde PSA i blodet har lav spesifisitet for prostatakreft, har man studert en rekke molekylære former av PSA for å se om disse viser bedre korrelasjon til malignitet i prostata. I blodet er mesteparten av PSA i kompleks med (bundet til) endogene proteaseinhibitorer som alfa-1-antikymotrypsin og alfa-2-makroglobulin (cPSA), mens bare 10–20% finnes i fri form som fritt PSA (fPSA). Summen av fritt og bundet PSA benevnes som total-PSA (fPSA + cPSA = tPSA). Beregning av forholdet mellom fritt og bundet PSA (fPSA/tPSA) kan gi en indikasjon på hvorvidt pasienten har en malign eller benign sykdom i prostata, siden man har vist at andelen fritt PSA er lavere hos menn med prostatakreft. Studier har vist at måling av fPSA/tPSA øker spesifisiteten med 20–40% i diagnostisk øyemed. Samme sensitivitet og spesifisitet oppnås ved måling av cPSA hos menn med tPSA større enn 2 ng/ml, og cPSA kan bli et alternativ til dagens bruk av fPSA/tPSA-ratio. Bruk av cPSA eller fPSA/tPSA kan redusere antall unødige biopsier med ca. 20%, men fremdeles vil man ta biopsier av noen friske menn. I motsetning til fritt PSA og total-PSA er det i dag ikke vanlig ved norske sykehus å serumbestemme cPSA.

Total-PSA i serum korrelerer dessuten med alder og prostata volum. På dette grunnlag er det utarbeidet aldersspesifikke referanseverdier for tPSA, og man kan beregne «PSA-tetthet», som er tPSA dividert med prostata volum. Siden det er vanskelig å måle prostatas volum nøyaktig, har PSA-tetthet, i likhet med aldersjustert PSA, liten betydning i den kliniske hverdag. Stigningen i tPSA-verdi over tid benyttes imidlertid til å vurdere risiko for utvikling av prostatakreft. En økning over 0,75 ng/ml/år antas å signalisere tilstedeværelse av maligne celler (13). Ulike molekylære varianter av fritt PSA kan også benyttes til å skille mellom benign, malign og aggressiv cancer (14).

På tross av spesifisitetsproblemene ved diagnostikk av prostatakreft, er PSA den beste serologiske tumormarkøren man har i klinisk medisin i dag og den eneste som rutinemessig kan benyttes til å identifisere sykdom i prostata.

Neuroendokrine markører

Forekomsten av neuroendokrine celler synes å være relatert til differensieringsgrad, androgenuavhengighet og dårlig prognose. De neuroendokrine cellene ligger spredt mellom epitelcellene i prostata, og de påvirker vekst og differensiering av omliggende kreftceller ved utskilling av vekstfaktorer og neuropeptider som serotonin, somatostatin og parathyroideahormonrelatert protein (PTHrP).

Tabell 1 Sannsynligheten for prostatakreft ved forskjellige tPSA-nivåer (mg/l) hos menn med normal prostatapalpasjon

PSA-nivå i serum	Sannsynlighet for prostatakreft (%)
< 2,5	Ukjent
2,5–4,0	10–20
4,1–10,0	25
> 10,1	50–60

Kromogranin A (CgA) og nevrospesifikk enolase produseres i de fleste endokrine- og neuroendokrine celler, og kan benyttes som markører for de neuroendokrine cellene i prostata (15). Man har vist at serumnivået av kromogranin A (s-CgA) og nevrospesifikk enolase er forhøyet i lavt differensierte og androgenresistente svulster. Svakheten ved kromogranin A og nevrospesifikk enolase som tumormarkører er at ikke alle maligne prostatasvulster inneholder neuroendokrine celler. Ved kastrasjonsbehandling (kjemisk eller kirurgisk) er imidlertid serum-kromogranin A nyttig for å måle behandlingens effekt. Høyt serumnivå av kromogranin A og lav total-PSA vil i dette tilfellet predikere dårlig prognose (16). Kromogranin A er dessuten nyttig for tidlig å kunne påvise utvikling av androgenresistent prostatakreft hos pasienter som har testet positivt for neuroendokrine celler (17).

Fremtidige markører

Når en normal celle utvikler seg til en kreftcelle, vil det gjenspeile seg i en endret sammensetning av proteiner (proteomikk). Proteinnivået kan reguleres på en rekke nivåer: eks. kromosomnivå (amplifikasjoner/delesjoner/mutasjoner), epigenetisk regulering (dvs. arvelige modifikasjoner av kromosomene som ikke gir mutasjoner, f.eks. hypereller hypometylering), transkripsjonsnivå (kopiering av gensekvens til budbringer RNA/mRNA), stabiliteten til budbringer RNA, translasjonseffektivitet (oversettelse av budbringer RNA-sekvens til aminosyresekvens/protein). I de tilfellene hvor reguleringen skjer på DNA-nivå, vil man også observere ulik sammensetning av budbringer RNA i kreftcellen sammenliknet med den tilsvarende friske cellen (DNA-mikromatrise). Ustabile kromosomer gir opphav til amplifikasjoner og delesjoner, slik at cellenes DNA-innhold endres og uttrykket av mRNA forandres. DNA-ploidianalyser bestemmer mengden DNA i cellekjernen og anses som en lovende prognostisk markør for prostatakreft (18). Epigenetiske endringer synes å spille en viktig rolle i initiering av prostatakreft, og påvisning av disse har potensial som diagnostiske markører.

Anvendelsen av DNA-mikromatrise og proteomikkteknologi har gitt håp om identifisering av nye potensielle biomarkører som man på sikt ønsker å benytte til å påvise prostatakreft, sykdomsprogresjon og prediksjon av overlevelse. Biomarkørene kan ha en funksjon i biologiske prosesser som celle-syklusregulering, apoptose, differensiering, signaloverføring (ofte effekt på androgenreseptor), metastasering og angiogenese. Blant kandidatene som nevnes er Bcl-2, p27^{Kip1}, E-cadherin og VEGF (vaskulær endotelial vekstfaktor) (19). Vi vil her konsentrere oss om et knippe interessante kandidater som har skilt seg ut i flere DNA-mikromatrise studier, inkludert hepsin, alfametylacyl-CoA-enzymet (AMACR), glutation-S-trans-

ferase- π (GSTP1), EZH2 og prostataspesifikk antigen 3 (DD3/PCA3) (20). Disse molekylenes funksjon i utvikling av prostatakreft og deres kliniske anvendelse som markører er foreløpig uavklart.

AMACR

AMACR er en av de best karakteriserte nye markørene for prostatakreft (21). I adenokarsinomvev og i premaligne lesjoner (eks. prostatic interepithelial neoplasia, PIN) i prostata finner man økt proteinnivå av AMACR sammenliknet med normalt prostatavev. Evaluering av AMACR-nivået i prostatavev demonstrerer opptil 97% sensitivitet og 92% spesifisitet for deteksjon av prostatakreft (22). Dessverre uttrykkes AMACR også i enkelte typer benignit kjer-telvev, men ifølge Jiang og medarbeidere tester ikke benignit vev positivt for AMACR og samtidig negativt for de basale cellemarkørene p63 og 34 β E12 (100% spesifisitet) (5). AMACR-nivået i blod eller urin kan foreløpig ikke benyttes som markør, fordi AMACR produseres i en rekke vev (23). AMACR koder for et enzym som er involvert i betaoksidasjonen av forgrenede fettsyrer, men dets rolle i progresjon av prostatakreft er ennå ikke kjent. Med mer kunnskap om dens biologiske rolle kan den vise seg å ha verdi for evaluering av prognose, men foreløpig er AMACR en diagnostisk markør for prostatakreft.

Hepsin

Hepsin er den markøren som hyppigst er funnet å være regulert når man sammenlikner genprofiler fra benignit og malignit prostatavev (mikromatrise studier) (24), og i likhet med AMACR er den oppregulert i kreftcellene. Hepsin er en serinprotease som påvirker cellevekst og morfologi. Til tross for at hepsin påvirker basalmembranstrukturen og dermed stimulerer metastasering, har flere studier vist at hepsinnivået er høyest i vev fra høygradig PIN og at nivået er redusert i metastatiske lesjoner (25).

GSTP1

GSTP1 vil, i motsetning til AMACR og hepsin som er oppregulert i primære prostatasvulster, være nedregulert hos over 80% av pasientene (26). GSTP1 er medlem av en stor familie av glutationtransferaser som har som oppgave å beskytte cellene mot oksidativ skade. Hypermetylering av reguleringsområdet til GSTP1-genet i PIN og prostatakreft medfører reduserte nivåer av GSTP1 i cellene. Dermed blir cellene mindre motstandsdyktige mot karsinogener fra beten-nelsesreaksjoner, mat og miljøgifter (20). Man kan kvantitere metyleringsstatus til GSTP1 ved hjelp av metyleringssensitiv polymerasekjedereaksjon (PCR) i så vel biopsi- og prostatektomimateriale som i celler fra serum, urin og seminalvæske. Metyleringsstatus for GSTP1 korrelerer ikke med PSA-nivå, og kan derfor muligens benyttes

som uavhengig diagnostisk, ikke prognostisk, markør for prostatakreft. Endringer i metyleringsstatus er vist hos en rekke gener under initiering og progresjon av prostatakreft, og i likhet med GSTP1 kan disse vise seg å bli nyttige markører (27). Fordelen med denne typen markører er at endringene kan detekteres med sensitive metoder som PCR og at parafininnstøpt vev kan benyttes som kilde.

EZH2

EZH2 er eksempel på et gen som først ble vist å være overuttrykt i hormonrefraktær prostatakreft (28), men som siden har vist seg å være induert i en rekke kreftformer. En sammenlikning av genuttrykkmønstre fra BPH, lokaliserte tumorer og hormonrefraktære, metastatiske prostatatumorer avslørte at EZH2 kan benyttes til å skille metastaserende og lokaliserte prostatasvulster. EZH2 er også en prognostisk kandidatmarkør, fordi høye konsentrasjoner av EZH2 i klinisk lokalisert prostatakreft synes å være assosiert med dårlig prognose (28). Foruten å regulere kromatinstrukturer (kromosomene består av både DNA og proteiner, DNA-protein-komplekset kalles kromatin), er det nylig vist at EZH2 er et målgen for E2F, og at den ved å binde pRB2/p130 kan øke transkripsjon av cyclin A og dermed i S-fase progresjon og proliferasjon (29).

PCA3

PCA3 er blant de mest spesifikke markørene for prostatakreft som hittil er beskrevet (30). Genet for PCA3, DD3, består av fire eksoner (kodende område av gen som oversettes til aminosyresekvens i proteiner). Det gir opphav til mange ulike mRNA (budbringer-RNA), men disse oversettes sannsynligvis ikke til proteiner i cellene. Budbringer-RNA som inneholder ekson 4, finner vi bare i prostatakreftceller. PCA3-ekspressjonen er sterkt forhøyet både i den primære prostatasvulsten og i metastaser fra prostatakreft. Et molekylært assay, uPM3, er utviklet for påvisning av PCA3 mRNA i urin, og preliminnære resultater fra kliniske studier viser betydelig forbedring av spesifisitet og positivt prediktivt verdi i forhold til måling av tPSA (31).

Prostatakreft er blant de mest heterogene kreftformene man kjenner. Derfor er det naturlig at en markør alene ikke kan gi kliniker fullgod informasjon vedrørende diagnostikk eller prognose. Ett eksempel på at kombinasjon av flere molekylære markører («multipleks tilnærming») øker prediksjonsverdien av prognose ved prostatakreft, er måling av E-cadherin (involvert i celleadhesjon) i kombinasjon med EZH2. Redusert nivå av E-cadherin sammen med høye nivåer av EZH2 er sterkt assosiert med tilbakefall av prostatakreft (32). Flere studier har også forsøkt å klassifisere prostatatumorene i undergrupper ved hjelp av mikromatrise-

studier, men resultatene er foreløpig sprikende. Sannsynligvis må disse studiene utføres på materiale fra enkeltkloner før man finner frem til ett konsensussett med gener som klassifiserer de ulike prostatakreftformene.

Proteomikkanalyser av serum fra pasienter med prostatakreft ser også ut til å gi lovende resultater for diagnostikk og prognose. Teknikkens potensial ligger i at man da kan analysere lavmolekylære metabolitter, peptider og proteinfragmenter som kan gi en høyere grad av nøyaktighet enn tradisjonelle biomarkører for kreftdeteksjon. Ved å benytte denne tilnærmingen vil proteomikkmodulene selv være diskriminatoren.

Bruk av DNA-mikromatrise og proteomikkteknologi har medført at listen av potensielle kandidatmolekyler for påvisning av prostatakreft, sykdomsprogresjon og prediksjon av overlevelse vokser raskt. Utfordringen nå vil derfor være å utvikle uniforme standarder for deres karakterisering, slik at sammenlikning og sortering av markører kan skje på tvers av studier og at aktuelle kandidater kan komme fra forsøkslaboratoriet til klinisk bruk hos pasienten.

Kampen mot prostatakreft fortsetter. I den postgenomiske æra er vi utstyrt med «massevåpen» som muliggjør full overvåking av de molekylære mekanismene som er involvert i karsinogenesen. Dette gir oss tro på at vi også innen diagnostikk av prostatakreft vil finne frem til markører og/eller signaturer (gen- og/eller proteinmønstre) som gjør det mulig å skille de «snille» fra de «slemme» kreftsvulstene. Samtidig må vi huske at prostatakreftcellene er i stadig endring og at vi trenger markører som oppdager når de går fra å være «snille» og hormonfølsomme til å bli «slemme» og hormonrefraktære. De molekylære mekanismer bak utvikling av hormonrefraktær prostatakreft kan dessuten være forskjellig fra pasient til pasient. Fremtidens medikamenter vil kreve kunnskap om pasientens svulster på molekylært nivå, slik at behandlingen kan

skreddersys til hver pasient for å sikre positiv respons.

Manuskriptet ble godkjent 24.8. 2005.

Litteratur

1. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF et al. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 1993; 150: 379–85.
2. Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8–29.
3. Roehl KA, Antenor JA, Catalona WJ. Serial biopsy results in prostate cancer screening study. *J Urol* 2002; 167: 2435–9.
4. Berner A, Skjorten FJ, Harvei S. Ikke-diagnostiserte mikroinvasive karsinomer i prostata. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1998; 118: 3408–12.
5. Jiang Z, Li C, Fischer A et al. Using an AMACR (P504S)/34betaE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 231–6.
6. Ostrander EA, Markianos K, Stanford JL. Finding prostate cancer susceptibility genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 151–75.
7. Edwards SM, Eeles RA. Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; 129: 65–73.
8. Sigurdsson S, Thorlacius S, Tomasson J et al. BRCA2 mutation in Icelandic prostate cancer patients. *J Mol Med* 1997; 75: 758–61.
9. Gronberg H, Ahman AK, Emanuelsson M et al. BRCA2 mutation in a family with hereditary prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 299–301.
10. Eide IA, Angelsen A. Prostataspesifikt antigen. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2000; 120: 2528–31.
11. Sandblom G, Varenhorst E, Lofman O et al. Clinical consequences of screening for prostate cancer: 15 years follow-up of a randomised controlled trial in Sweden. *Eur Urol* 2004; 46: 717–23.
12. Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1373–7.
13. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992; 267: 2215–20.
14. Mikolajczyk SD, Song Y, Wong JR et al. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnosis? *Clin Biochem* 2004; 37: 519–28.
15. Angelsen A, Syversen U, Haugen OA et al. Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings? *Prostate* 1997; 30: 1–6.
16. Isshiki S, Akakura K, Komiya A et al. Chromogranin a concentration as a serum marker to predict prognosis after endocrine therapy for prostate cancer. *J Urol* 2002; 167: 512–5.
17. Chevillet JC, Tindall D, Boelter C et al. Metastatic prostate carcinoma to bone: clinical and pathologic features associated with cancer-specific survival. *Cancer* 2002; 95: 1028–36.
18. Danielsen HE, Kildal W, Sudbo J. Digital bildebehandling i patologiaget – eksemplifisert ved cancer prostatae. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2000; 120: 479–88.
19. Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 2005; 41: 858–87.
20. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3943–53.
21. Luo J, Zha S, Gage WR et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 2220–6.
22. Jiang Z, Wu CL, Woda BA et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology* 2004; 45: 218–25.
23. Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG et al. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. *J Urol* 2004; 172: 1130–3.
24. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412: 822–6.
25. Vasioukhin V. Hepsin paradox reveals unexpected complexity of metastatic process. *Cell Cycle* 2004; 3: 1394–7.
26. Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS et al. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *Eur Urol* 2004; 46: 698–708.
27. Li LC, Carroll PR, Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 103–15.
28. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624–9.
29. Bracken AP, Pasini D, Capra M et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323–35.
30. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology* 2003; 62: 34–43.
31. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 44: 8–15.
32. Rhodes DR, Sanda MG, Otte AP et al. Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 661–8.